

공개특허 2001-0100588

(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)(51) . Int. Cl. 7  
A61F 9/00(11) 공개번호 특2001-0100588  
(43) 공개일자 2001년11월14일(21) 출원번호 10-2000-0023862  
(22) 출원일자 2000년05월04일(71) 출원인 정원태  
서울 서초구 잠원동 한신5차아파트 118동 403호  
노세현  
부산 서구 동대신동3가 1 동아대학교부속병원 안과  
박우찬  
부산 서구 동대신동3가 1 동아대학교부속병원 안과(72) 발명자 노세현  
부산 서구 동대신동3가 1 동아대학교부속병원 안과  
박우찬  
부산 서구 동대신동3가 1 동아대학교부속병원 안과  
정원태  
서울 서초구 잠원동 한신5차아파트 118동 403호  
윤희성  
부산광역시사하구신평동신익상변APT104-1107  
유정원  
부산광역시서구동대신동2가3203/7  
김재환  
서울특별시송파구가락동우성APT3-305

심사청구 : 있음

(54) 엑시머레이저 각막절제술 후 항염증, 항섬유화, 조직유착및 반흔형성억제 작용을 가지는 양막의 약학적 조성물

## 요약

본 발명은 엑시머레이저 각막절제술후 각막 상피하 혼탁 등의 후유증을 억제하기 위해 항염증, 항섬유화, 조직유착 및 반흔형성억제라는 용도를 가지는 양막을 유효성분으로하는 약학적 조성물에 관한 것이다. 더욱 구체적으로 본 발명은 양막을 마쇄, 동결건조 및 밀균 처리 후 약학적 조성물로 제조하여 여러 다양한 안과 수술 및 피부의 창상부위에 도포함으로써 생리적인 항염증, 항섬유화작용및 외과수술시 조직유착이나 반흔형성을 무작용없이 억제할수 있다.

## 색인어

양막, 연고, 각막절제술, 항염증, 항섬유화

공개특허 2001-0100588

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

엑시머레이저 각막절제술은 근시 및 난시 같은 굴절이상과 표층각막혼탁을 교정하기 위한 레이저 수술로 1995년 미국 FDA에서 공인된 안전하고 정교한 수술법이다. 그러나 수술 후 심한 통증, 각막 상피하 혼탁과 근시로의 퇴행같은 합병증 및 후유증이 문제점으로 지적되고 있다. 이러한 각막혼탁과 근시로의 퇴행은 엑시머레이저 각막절제술 직후 각막실질세포의 소실과 밀접한 연관성이 있는 것으로 알려져 있다.

Dohlman 등 [C.H. Dohlman et al., Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 1968: 16, P520-534]이 각막상피제거 후 각막 실질세포의 소실을 처음 발견하였고, 최근 Wilson 등 [S.E. Wilson et al., Exp. Eye Res., 1996: 62, P325-337]과 Gao 등 [J. Gao et al., Cornea, 1997: 16, P200-208]은 엑시머레이저 각막절제술 후 각막 실질세포의 소실이 apoptosis에 의해 유발된다고 주장하였다. 또 Wilson 등 [S.E. Wilson and Kim W.J., Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 1998: 39, P220-226]은 각막실질세포의 apoptosis가 초기 창상 치유과정에서 방어적 역할을 하는 중요한 유발인자이며 apoptosis의 정도가 엑시머레이저 근시교정술 (photorefractive keratectomy) 이후 각막 혼탁과 밀접한 관계가 있다고 하였다. Apoptosis는 특징적인 조직변화를 보이는 계획된 세포의 자살로서, 조직의 분화, 발달, 감염과 장상 치료반응에 중요한 역할을 하는 생리학적 과정이다. 엑시머레이저 근시교정술 후 각막 실질세포의 apoptosis에 대해 여러 가설이 있는데, 엑시머레이저 자체에 의한 각막실질외 직접적인 손상과 국소 발열반응, 염증세포침윤, 손상된 상피세포로부터 유리되는 interleukin-1 등의 여러가지 요인이 복합적으로 관여하는 것으로 알려져 있다.

발명자들은 엑시머레이저 근시교정술 후 양막이식이 각막상피 재생을 촉진시키고 염증세포침윤을 억제하며, cell membrane의 oxidative damage를 반영하는 세포막 지질과산화 (lipid peroxidation)을 억제하여 궁극적으로 keratocyte apoptosis와 각막혼탁을 줄일 수 있는 방법을 연구한 바 있다.

양막은 태반에 붙어 있으며 태아를 싸고 있는 안쪽의 얇은 반 투명한 막으로 simple cuboidal epithelium과 두꺼운 basement membrane과 avascular mesenchymal stroma로 구성되어 있다. 양막이식은 안과영역에서 상피화를 촉진시키고 염증을 감소시키며, 신생 혈관형성을 억제하여 반흔형성을 최소화하는 효과가 있으며 이식하여도 거부반응이 없다. 발명자들의 연구 결과 염증세포의 침윤과 keratocyte apoptosis는 밀접한 연관관계가 있으며, 양막은 염증세포를 흡착시켜 각막 실질 내로 침윤되지 못하게 하는 효과가 있음을 알아내었다. 기존 연구에서는 가토에서 엑시머레이저 각막절제술 후 양막을 각막 위에 10-0 nylon 봉합사로 봉합하여 봉합에 의한 인위적인 염증이 유발되는 문제점이 있었고, 임상 적용 시에는 술 후 양막을 고정시키기 위해 장시간 양막을 창상부위에서 부착 건조시키고 콘택트렌즈를 착용시켜야 하는 문제점이 있었다.

따라서 본발명은 엑시머레이저 각막절제술 후 임상적으로 나타나는 여러가지 후유증을 부작용없이 억제할수 있는 임상약물의 개발을 위한 것이다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명의 과제는 염증세포 흡착작용과 상피화 촉진작용 및 항섬유화작용이 있는 양막을 마세, 동결건조 및 멸균처리 후 안연고로 제조하여 엑시머레이저 근시교정술후 점안하여 각막실질에 염증세포의 침윤과 각막실질세포의 초기 apoptosis와 cell membrane의 lipid peroxidation을 억제하는 임상약물을 제조하는데 있다.

공개특허 2001-0100588

## 실험의 구성 및 작용

## 실시예 1. 양막 채취 및 보관

양막을 얻기 위해 HIV, HBV, HCV, syphilis가 없는 산모의 제왕절개 후 얻은 태반을 lamina flow hood내에서 항생제가 첨가된 sterile PBS로 세척한 후 양막(amnion)을 chorion(유모막)으로부터 박리하고 nitrocellulose paper에 양막의 basement membrane이 위로(stroma side down) 가도록 펴서 부착시킨 후 DMEM(Dulbecco - modified Eagle medium)과 glycerol이 1:1 (vol/vol)로 혼합된 용액에 넣어 -80 C에 보관한 후 연고 제조를 위해 사용한다.

## 실시예 2. 양막제제 제조

보관된 양막을 -80 C 냉동실에서 꺼내 실온에서 녹인 후 nitrocellulose paper에서 양막을 떼어내고 묻어 있는 배양액을 생리식염수로 세척한다. 무게를 측정 후 조직 마쇄기에 넣고 잘게 분쇄시킨 후 동결건조기에서 건조시킨다. 5  $\mu$ m 이하만 여과되는 filter에 통과시킨 후 평균과정을 거친다. 안연고의 기질이 되는 바셀린(75), 파라핀(15), 라놀린(5)에 만들어진 양막분말(5)을 첨가하고, 전막낭 내에 장기간 잔존하도록 주도 250 - 270mm, 안구표면에 잘 퍼지게 하기 위해 용점 35 $^{\circ}$ C로 맞추어 안연고를 제조한다.

## 실시예 3. 약효비교 실험

## i) 가토 엑시머레이저 시술

체중 2-3kg인 백색 가토 20마리 40안을 대상으로 하였고, 마취를 위해 실험동물에 각각 50mg의 ketamine hydrochloride와 xylazine hydrochloride를 근육주사하였다. 각막상피를 기계적으로 제거한 후 엑시머레이저 각막절제술을 시술 한 후 한 쪽 눈에는 양막연고를, 반대쪽 눈에는 기질만 들어있는 연고를 점안하여 대조군으로 한다. 자세히 방법을 기술하면, 각막상피의 기계적 제거를 위해 개검기로 각막을 노출시킨 후 7 mm marker로 각막 중심부를 표시한 후 A MOILS Epithelial scrubber (Innova, USA)에 6 mm 직경의 brush를 부착하여 각막상피를 7 mm 직경으로 제거한다. 엑시머레이저는 flying spot방식의 193 nm 레이저 시스템(Telco, Australia)을 사용하여 직경 5 mm, -9 D. single zone으로 96  $\mu$ m 깊이로 각막실질을 절제한다. 우안은 양막연고를 점안한 실험군으로, 좌안은 양막성분만 빠진 기질연고를 점안하여 대조군으로 하였다. 모든 실험동물은 시술후 상하안검을 반창고로 붙이고 마취가 깰때까지 눈을 감겨놓아 각막의 건조를 방지하였다. 시술후 8시간, 16시간후 추가로 연고를 점안하고 24시간째 과용량의 phenobarbital을 귀정맥에 주사하여 희생시키고, 각막윤부를 포함하여 각막을 적출 하였다. 각막을 평평하게 유지시키기 위해 4 곳에 방사상 이완 절개를 한 후, 수술현미경하에서 상피결손부위가 중심에 오도록 하여 각막을 반으로 잘라 10 X 10 mm 크기의 cryoblock에 넣고 OCT 컴파운드(Sakura Finetek, USA)에 포매시킨 후 액체질소에 넣어 급속 냉동한다. 냉동 조직을 microtome으로 6  $\mu$ m 두께로 잘라 염색에 사용한다.

## ii) 염색 및 cell count

냉동 조직을 microtome으로 6  $\mu$ m 두께로 잘라 표본 슬라이드들 제작하였는데 매 5번째 슬라이드를 Hematoxylin-Eosin (H&E) 염색하여 광학 현미경으로 각막 상피 결손 부위와 엑시머레이저 각막절제 부위를 확인한 후 염색된 표본 슬라이드는 다른 염색을 위해 사용하였다. H&E 염색된 조직에서 광학현미경을 이용하여 연속된 5 개의 고배율시야( $\times 400$ )에서 각막실질에 침윤된 다형핵백혈구(polymorphonuclear cell, PMN) 수를 더하여 계산하였다. Apoptosis를 분석하기 위해서 fluorescein based in situ - death detection kit (Boehringer Mannheim, USA)를 이용하여 TUNEL (terminal deoxyribonucleotidyl transferase mediated dUTP - digoxigenin nick end labeling) 염색을 하고 대조염색을 위해 propidium iodide/antifade (Oncor, USA)를 사용한다. 형광현미경 (Carl Zeiss, Germany)의 excitation 과 emission 필터를 적절히 조합하여 apoptosis를 일으킨 세포는 초록색형광으로, 대조염색인 propidium

공개특허 2001-0100588

Iodide에 염색된 세포는 붉은색형광으로 나타나게 하여 apoptotic nucleus를 관찰하고, 연속한 5개의 고배율시야( $\times 400$ )에서 각막실질세포 apoptosis 수를 측정하여 합한다.

엑시머레이저 조사에 의해 생성된 산소유리기에 의한 세포막 지질 과산화(lipid peroxidation) 정도를 알아보기 위해 지질 과산화의 최종 산물인 malondialdehyde (MDA)을 Vectastain Elite ABC Kit (Vector, USA)을 이용하여 특수 면역 화학 염색하였다. 일차항체는 MDA에 대한 쥐의 다크론성의 항체로, 이차항체는 biotinylated goat derived anti-rat IgG를 사용하였으며, diaminobenzidine tetrachloride(DAB)를 과산화효소 기질로 사용하여 발색반응을 시키고 이를 광학현미경으로 관찰하였다. 각 측정치는 ANOVA와 Wilkason signed rank test로 통계처리 하여 양막연고의 항 염증작용과 각막실질세포의 apoptosis 억제작용, lipid peroxidation 억제작용을 알아본다.

### iii) 결과

각막실질에 침윤된 염증세포와 TUNEL positive Apoptotic keratocyte 수는 실험군인 양막연고군이 대조군에 비해 통계적으로 의미있게 적었다. lipid peroxidation을 반영하는 MDA stain도 양막연고군이 대조군에 비해 염색의 강도가 적었다.

표 1. TUNEL( keratocyte apoptosis 수: 연속된 X 400 high power field 5곳에서

count))

Rabbits	OD(AM oint group)					sum	평균	p
1	1	1	1	1	1	5	1.00	
2	6	6	9	1	1	23	4.60	
3	3	2	2	1	2	10	2.00	
4	1	1	1	2	1	6	1.20	
5	3	1	1	2	1	8	2.00	
6	3	5	1	2	4	15	3.00	
7	2	2	1	3	1	9	1.80	
8	1	2	3	2	1	9	1.80	
9	3	4	3	2	2	14	2.80	
10	8	2	2	2	2	16	3.20	
							2.34	0.000116

공개특허 2001-0100588

	OS(Control)						평균
1	4	8	9	10	12	43	8.60
2	22	11	23	23	28	107	21.40
3	10	12	8	7	5	42	8.40
4	2	1	8	7	4	22	4.40
5	12	9	7	13	7	48	9.60
6	3	9	17	16	3	48	9.60
7	18	17	6	7	13	61	12.20
8	12	3	5	7	15	42	8.40
9	18	16	12	5	17	68	13.60
10	13	5	4	7	6	35	7.00
							10.32

《t-검정: 쌍체 비교》

	변수 1	변수 2
평균	11.5	51.6
분산	30.0556	540.2667
관측수	10	10
피어슨 상관 계수	0.72982	
가설 평균차	0	
자유도	9	
t 통계량	-6.4684	
P(T<=t) 단측 검정	5.8E-05	
t 기각치 단측 검정	1.83311	
P(T<=t) 양측 검정	0.00012	
t 기각치 양측 검정	2.26216	

표 2. H&amp; E( 각막내 염증세포수: 연속된 X400 high power field 5곳에서

count)

Rabbits	OD(AM oint group)					sum	평균	p
1	32	53	78	44	27	234	46.8	
2	15	17	21	28	27	108	21.6	
3	14	27	30	19	25	115	23	
4	45	48	62	34	85	274	54.8	
5	17	16	16	14	29	92	18.4	
6	24	27	33	24	27	135	27	
7	42	94	60	78	77	351	70.2	
8	8	7	9	8	5	37	7.4	
9	14	15	15	17	12	73	14.6	
10	54	48	66	78	40	286	57.2	
							34.1	0.003578949

공개특허 2001-0100588

	OS(Control)						평균
		77	88	97	100	420	84
1	58	44	58	98	87	374	74.8
2	87	29	44	22	21	143	28.6
3	27	95	85	121	88	466	93.2
4	77	21	27	45	13	124	24.8
5	18	23	30	31	37	173	34.6
6	52	115	38	44	52	371	74.2
7	122	17	13	22	27	121	24.2
8	42	42	41	35	27	183	36.6
9	38	55	61	87	131	371	74.2
10	37						51.92

## 《t-검정: 양제 비교》

	변수 1	변수 2
평균	170.5	274.6
분산	11378.05556	18727.4
편차수	10	10
피어슨 상관 계수	0.788075766	
가설 평균차	0	
자유도	9	
t 통계량	-3.907387395	
P(T<=t) 단측 검정	0.001789475	
t 기각치 단측 검정	1.833113856	
P(T<=t) 양측 검정	0.003578949	
t 기각치 양측 검정	2.262158887	

## 발명의 효과

사용하기 간편한 양막연고는 엑사머레이저 각막절제술등 여러 다양한 안과수술 및 피부의 창상부위에 도포 함으로서 부작용없이 생리적인 항염증, 항섬유화작용을 나타낼 수 있을 것으로 기대하며 외과수술시 조직유착이나 반흔형성을 억제할 목적으로도 활용될 수 있다.

## (57) 청구의 범위

## 청구항 1.

유효한 성분을 함유한 양막의 채취방법 및 보관방법.

## 청구항 2.

양막을 유효성분으로 함유하는 함염증 및 항섬유화 작용을 나타내는 안연고의 제조방법 및 조성물.

DERWENT-ACC-NO: 2002-278350

DERWENT-WEEK: 200353

COPYRIGHT 2004 DERWENT INFORMATION LTD

TITLE: Pharmaceutical composition of amnion  
having anti-inflammatory, anti-fibrosis,  
cellular adhesion and scar formation preventing actions  
after excimer laser photorefractive keratectomy

INVENTOR: JUNG, W T; KIM, J C ; PARK, W C ; RHO, S H ; YOO,  
G W ; YOON, H S  
; CHUNG, W T ; NOH, S H

PRIORITY-DATA: 2000KR-0023862 (May 4, 2000)

PATENT-FAMILY:

PUB-NO	PAGES	PUB-DATE	MAIN-IPC
KR 377921 B		March 29, 2003	N/A
000	A61K 035/50		
KR 2001100588 A		November 14, 2001	N/A
000	A61F 009/00		

INT-CL (IPC): A61F009/00, A61K035/50

ABSTRACTED-PUB-NO: KR2001100588A

BASIC-ABSTRACT:

NOVELTY - A pharmaceutical composition of amnion having anti-inflammatory, anti-fibrosis, cellular adhesion and scar formation preventing actions after excimer laser photorefractive keratectomy is provided to cause physiological anti-inflammatory and anti-fibrosis actions and restrain cellular adhesion or scar formation during surgical operation without side effects by coating the

composition on areas of various ophthalmic operations and gash of skin after manufacturing the amnion into the pharmaceutical composition.

DETAILED DESCRIPTION - A method for collecting and storing amnion containing an active ingredient comprises processes of separating the amnion from chorion after washing a placenta with an antibiotic added sterile PBS in a lamina flow hood; and storing the amnion at -80 degrees C in the mixed solution by putting the amnion into a solution in which DMEM (Dulbecco-Modified Eagle Medium) and glycerol are mixed in a volume ratio of 1:1 after spreading and adhering the amnion to a nitrocellulose paper so that a basement membrane of the stroma side is down. The method for manufacturing an ophthalmic ointment showing anti-inflammatory and anti-fibrosis actions containing the amnion as an active ingredient comprises the processes of detaching the amnion from the nitrocellulose paper after melting the amnion at a normal temperature that is kept in a freezer of -80 degrees C, and then washing the stained culture fluid with a physiological salt solution; drying the milled amnion in a freeze dryer after measuring the weight of the amnion and milling the amnion to small pieces in a texture mill; passing the filtered powder through sterilizing process after filtering the dried milled amnion with a filter through which particles of the amnion of 5 microns or less are filtered; and manufacturing an ophthalmic ointment by maintaining a melting point of 35 degrees C so that the ointment remains in conjunctival sac for a long period of time after adding the manufactured powder of the amnion to matrices of vaseline, paraffin and lanolin.



## Korea patent office (KR) Unexamined Patent

KOREAN

(51) Int.Cl. A61F 9/00

Publication No 10-2001-0100588

Publication Date 2001-11-14

Application No 10-2000-0023862

Application Date 2000-05-04

Inventor

Se-Hyeon Noh

U-Chan Park

Won-Tae Jeong

Hui-Seong Yoon

Gyeong-Won Yu

Jae-Chan Kim

Applicant

Won-Tae

Jeong

Se-Hyeon

Noh

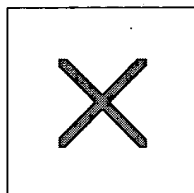
U-Chan Park

Examination

Requested

Title of Invention

PHARMACEUTICAL COMPOSITION CONTAINING AMNIOTIC MEMBRANE HAVING  
ANTI-INFLAMMATORY, ANTI-FIBROBLASTIC AND ANTI-SCARING EFFECTS AFTER  
PHOTOREFRACTIVE KERATECTOMY



### \* Legal Status

Date of request for an examination	20000504
Notification date of refusal decision	00000000
Final disposal of an application	registration
Date of final disposal of an application	20040728
Patent registration number	1003779210000
Date of registration	20030314
Number of opposition against the grant of a patent	102003500098
Date of opposition against the grant of a patent	20030617
Number of trial against decision to refuse	
Date of requesting trial against decision to refuse	
Date of extinction of right	



## Abstract

The present invention relates to the pharmaceutical composition having the amnion which has an anti-inflammation, an anti-fibroblastic, and use called the tissue adhesion and scar formation inhibition in order to suppress a sequela including the Corneale hazy etc. after the photorefractive keratectomy as the effective component. More concretely, the present invention crushes an amnion. It manufactures with the pharmaceutical composition after a freeze-drying and Sterilization processing and it coats the wound part of the skin and the various ophthalmology operation, it can suppress the tissue adhesion or the ulosis in the physiological anti-inflammation, and the anti-fibroblastic action and surgical operation without the side effect.

본 발명은 엑시머레이저 각막절제술후 각막 상피하 혼탁 등의 후유증을 억제하기 위해 항염증, 항섬유화, 조직유착 및 반흔형성억제라는 용도를 가지는 양막을 유효성분으로하는 약학적 조성물에 관한 것이다. 더욱 구체적으로 본 발명은 양막을 마쇄, 동결건조 및 멸균 처리 후 약학적 조성물로 제조하여 여러 다양한 안과 수술 및 피부의 창상부위에 도포 함으로서 생리적인 항염증, 항섬유화작용및 외과수술시 조직유착이나 반흔형성을 부작용없이 억제할수 있다.



## Keyword(s)

The amnion, ointment, kerectomy, anti-inflammation, anti-fibroblastic.



## Description

### ■ Details of the Invention

#### ■ Purpose of the Invention

- \* The Technical Field to which the Invention belongs and the Prior Art in that Field

The photorefractive keratectomy is the safe and elaborate surgical operation method which is authorized to the ametropia which is the same as that of the myopia and astigmatism and the laser operation for correcting the superficial layer corneal opacity in 1995 year US Food and Drug Administration. But a complication and the sequela which is the same as that of the severe pain, and the degeneration of the Corneale hazy and myopia after an operation are indicated into a problem. The degeneration of this corneal opacity and myopia is known that it has the correlation related to the disappearance of the photorefractive keratectomy immediately after keratocyte.

엑시머레이저 각막절제술은 근시 및 난시 같은 굴절이상과 표층각막혼탁을 교정하기 위한 레이저 수술로 1995년 미국 FDA에서 공인된 안전하고 정교한 수술법이다. 그러나 수술 후 심한 통증, 각막 상피하 혼탁과 근시로의 퇴행같은 합병증 및 후유증이 문제점으로 지적되고 있다. 이러한 각막혼탁과 근시로의 퇴행은

엑시머레이저 각막절제술 직후 각막실질세포의 소실과 밀접한 연관성이 있는 것으로 알려져 있다.

[C.H. Dohlman et al., Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 1968: 16, P520-534] including Dohlman etc. discovered the disappearance of a keratocyte after the Corneale removal for the first time. Recently, as to [S.E. Wilson et al., Exp. Eye Res., 1996: 62, P325-337] and Gao, including, [J. Gao et al., Cornea, 1997: 16, P200-208] including Wilson etc, it insisted after the photorefractive keratectomy that the disappearance of a keratocyte was caused by the apoptosis. And in the apoptosis of a keratocyte is the initial cut-healing process, [S.E. Wilson and Kim W.J., Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 1998: 59, P220-226] including Wilson etc were the important inducer serving with trigger and thereafter the close relationship had the extent of the apoptosis with the corneal opacity with the excimer laser \*\*\* (photorefractive keratectomy). The Apoptosis is the suicide of the prepared cell showing the organizational change. It is the physiological course playing the role of being important in the differentiation of an organization, a development, and an infection and wound treatment reaction. It has the different temporary installation after the excimer laser \*\*\* about the apoptosis of a keratocyte. It is known that the different kinds factor including the direct damage of the corneal stroma by the excimer laser itself and interleukin-1 etc. compositively engages and isolated from the local exothermic reaction, the inflammation cell permeation, and the damaged epithelial cell it has.

Dohlman 등 [C.H. Dohlman et al., Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 1968: 16, P520-534]이 각막상피제거 후 각막실질세포의 소실을 처음 발견하였고, 최근 Wilson 등 [S.E. Wilson et al., Exp. Eye Res., 1996: 62, P325-337] 과 Gao 등 [J. Gao et al., Cornea, 1997: 16, P200-208]은 엑시머레이저 각막절제술 후 각막 실질세포의 소실이 apoptosis에 의해 유발된다고 주장하였다. 또 Wilson 등 [S.E. Wilson and Kim W.J., Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 1998: 59, P220-226]은 각막실질세포의 apoptosis가 초기 창상 치유과정에서 방아쇠 역할을 하는 중요한 유발 인자이며 apoptosis의 정도가 엑시머레이저 근시교정술 (photorefractive keratectomy) 이후 각막 혼탁과 밀접한 관계가 있다고 하였다. Apoptosis는 특징적인 조직변화를 보이는 계획된 세포의 자살로서, 조직의 분화, 발달, 감염과 창상 치료반응에 중요한 역할을 하는 생리학적 과정이다. 엑시머레이저 근시교정술 후 각막 실질세포의 apoptosis에 대해 여러 가설이 있는데, 엑시머레이저 자체에 의한 각막실질의 직접적인 손상과 국소 발열반응, 염증세포침윤, 손상된 상피세포로부터 유리되는 interleukin-1 등의 여러가지 요인이 복합적으로 관여하는 것으로 알려져 있다.

An inventor etc accelerate the Corneale regeneration and the amnion transplant suppresses the inflammation cell permeation after the excimer laser \*\*\*. And it solves the process for suppressing the cell membrane lipid peroxidation reflecting the oxidative damage of the cell membrane and ultimately decreasing the keratocyte apoptosis and corneal opacity.

발명자들은 엑시머레이저 근시교정술 후 양막이식이 각막상피 재생을 촉진시키고 염증세포침윤을 억제하며, cell membrane의 oxidative damage를 반영하는 세포막 지질과산화 (lipid peroxidation)을 억제하여 궁극적으로 keratocyte apoptosis와 각막혼탁을 줄일 수 있는 방법을 연구한 바 있다.

As to an amnion, while sticking to a placenta, it is the fetus comprised of the fair with the half of the inside thin pee film of the simple cuboidal epithelium, the basement membrane and the thick avascular mesenchymal stroma. In the ophthalmological sphere, the amnion transplant accelerates an epithelialization and it makes an inflammation lessen. And the amnion transplant has the effect suppressing an anti-angiogenic and minimizes the ulosis and even if it transplants, the effect does not have a rejection. An infiltration and keratocyte apoptosis of the research result inflammation cell including an inventor etc had the close associative relationship. And it absorbed the inflammation cell and an amnion found that it had the effect that did not make permeated within the corneal stroma. There is a problem that in the existing research, an amnion was sutured in a rabbit

after the photorefractive keratectomy on a cornea to 10-0 nylon sealing fiber and it had the problem that the artificial inflammation by the sealing was caused. The long time amnion is adhere and dry let in the wound part in order to fix an amnion in the clinical application after a liquor and the contact lens has to be worn.

양막은 태반에 붙어있으며 태아를 싸고 있는 안쪽의 얇은 반 투명한 막으로 simple cuboidal epithelium과 두꺼운 basement membrane과 avascular mesenchymal stroma로 구성되어 있다. 양막이식은 안과영역에서 상피화를 촉진시키고 염증을 감소시키며, 신생 혈관형성을 억제하여 반흔형성을 최소화하는 효과가 있으며 이식하여도 거부반응이 없다. 발명자등의 연구 결과 염증세포의 침윤과 keratocyte apoptosis는 밀접한 연관관계가 있으며, 양막은 염증세포를 흡착시켜 각막 실질 내로 침윤되지 못하게 하는 효과가 있음을 알아내었다. 기존 연구에서는 가토에서 엑시머레이저 각막절제술 후 양막을 각막 위에 10-0 nylon 봉합사로 봉합하여 봉합에 의한 인위적인 염증이 유발되는 문제점이 있었고, 임상 적용 시에는 술 후 양막을 고정시키기 위해 장시간 양막을 창상부위에서 부착 건조시키고 콘택트렌즈를 착용시켜야 하는 문제점이 있었다.

Therefore, the present invention is the thing for the development of the clinical drug continued with number suppresses the different kinds sequela which clinically shows up after the excimer laser keratectomy without the side effect.

따라서 본발명은 엑시머레이저 각막절제후 임상적으로 나타나는 여러가지 후유증을 부작용없이 억제할수 있는 임상약물의 개발을 위한 것이다.

#### • The Technical Challenges of the Invention

The subject of the present invention pulverizes the inflammation cell adsorption, the epithelialization acceleration and the amnion in which it has the anti-fibroblastic action. It manufactures the clinical drug manufacturing with the eye ointment after a freeze-drying and Sterilization processing and drops lotion after the excimer laser myopia control and suppresses the lipid peroxidation of the initial apoptosis of the infiltration of the inflammation cell and keratocyte and cell membrane in the corneal stroma.

본 발명의 과제는 염증세포 흡착작용과 상피화 촉진작용 및 항섬유화작용이 있는 양막을 마세, 동결건조 및 멸균처리 후 안연고로 제조하여 엑시머레이저 근시조정술후 점안하여 각막실질에 염증세포의 침윤과 각막실질세포의 초기 apoptosis와 cell membrane의 lipid peroxidation 을 억제하는 임상약물을 제조하는데 있다.

#### ■ Structure & Operation of the Invention

The embodiment 1. amnion picking and keeping.

##### 실시에 1. 양막 채취 및 보관

After putting into the solution in which it peels off the amnion from the chorion after washing the placenta obtained after the Caesarean operation of the woman delivered of a child without the HIV, HBV, HCV, syphilis to the sterile PBS in which it is attached to an antibiotic in the lamina flow hood in order to obtain an amnion and the DMEM (Dulbecco-modified Eagle medium) and glycerol are mixed to 1:1 (vol/vol) after it spreads so that the basement membrane of an amnion go to the nitrocellulose paper with the consolation (stroma side down) and attaching and keeping in -80°C, it uses for the ointment Holotrichia.

양막을 얻기 위해 HIV, HBV, HCV, syphilis가 없는 산모의 제왕절개 후 얻은 태반을 lamina flow hood내에서 항생제가 첨부된 sterile PBS로 세척한 후 양막(amnion)을 chorion(융모막)으로부터 박리하고 nitrocellulose paper에 양막의 basement membrane이 위로 (stroma side down) 가도록 펴서 부착시킨 후 DMEM(Dulbecco-modified Eagle medium)과 glycerol이 1:1 (vol/vol)로 혼합된 용액에 넣어 -80°C에 보관한 후 연고 제조를 위해 사용한다.

Embodiment 2. amnion medicine manufacture.

## 실시에 2. 양막제제 제조

The culture fluid which removes an amnion in the nitrocellulose paper after taking the kept amnion out of -80°C freezer and melting in the room temperature and buries is washed to the saline solution. After measuring the weight, it puts into the organization crushing device and after small pieces shattering to pieces, it dries in the freezing dryer. After passing through in the filter filtered less than 5  $\mu\text{m}$ , the sterilization process is passed through. The made amnion powder (5) is added in the petrolatum (75) which becomes substrate of the eye ointment, the paraffin (15), and the lanolin (5). In order to well spread to the consistency 250-270mm, and the surface of eyeball in order to remain within the conjunctival sac for a long term, it fits with the melting point 35°C and the eye ointment is manufactured.

보관된 양막을 -80°C 냉동실에서 꺼내 실온에서 녹인 후 nitrocellulose paper에서 양막을 떼어내고 묻어 있는 배양액을 생리식염수로 세척한다. 무게를 측정한 후 조직 마쇄기에 넣고 잘게 분쇄시킨 후 동결건조기에서 건조시킨다. 5  $\mu\text{m}$  이하만 여과되는 filter에 통과시킨 후 멸균과정을 거친다. 안연고의 기질이 되는 바셀린(75), 파라핀(15), 라놀린(5)에 만들어진 양막분말(5)을 첨가하고, 결막낭 내에 장기간 잔존하도록 주도 250-270mm, 안구표면에 잘 퍼지게 하기 위해 융점 35°C로 맞추어 안연고를 제조한다.

Embodiment 3. effect of medicine comparison experiment.

## 실시에 3. 약효비교 실험

□) Rabbit excimer laser surgical operation.

□) 가토 엑시머레이저 시술

It did against the white rabbit 20 head 40 inside which was the weight 2-3kg. The ketamine hydrochloride and xylazine hydrochloride of the respective 50mg were muscle injected for the anesthesia in the experimental animals. After performing the photorefractive keratectomy after mechanically removing Corneale, the ointment which a substrate is contained is applied in the opposite side eye and the amnion ointment is in one side eye to the control group. In detail, if a method is recorded, after a cornea is exposed for the mechanical removal of Corneale to a canine be black, the cornea central part is indicated by 7 mm marker, the brush of 6 mm diameter is adhered to the AMOILS Epithelial scrubber (Innova, USA) and Corneale is removed to 7 mm diameter. The excimer laser controls the corneal stroma to the diameter 5 mm, -9 D/6, and the single zone to 96  $\mu\text{m}$  depth by using 193 nm laser system (Telco, Australia) of the flying spot mode. {NEWC applied the substrate ointment which the amnion component came off and a left-eye the amnion ointment to the experimental group dropping

lotion to the control group. All experimental animals adhered top and bottom eyelid to the plaster after the surgical operation and until the anesthesia broke, it let the eye fall shut and it prevented the drying of a cornea. An ointment was applied and the phenobarbital of the overcapacity was scanned on the ear vein after the surgical operation after 8 hours, 16 hours to an addition in 24 hours and it victimized. A cornea was extracted including the corneal limbus. After it cuts out in 4 place with the radial relax in order to flat maintain a cornea, after the epithelium deficit part comes at a center under the surgery microscope and a cornea is cut off with the half, putting into the cryoblock of 10 X 10 mm size and letting be formatted to the OCT compound (Sakura Finetek, USA), it puts into the liquid nitrogen and it fasts cool. The freezing organization is cut with a microtome with 6  $\mu$ m thickness, it uses in the dyeing.

체중 2-3kg인 백색 가토 20마리 40안을 대상으로 하였고, 마취를 위해 실험동물에 각각 50mg의 ketamine hydrochloride와 xylazine hydrochloride를 근육주사하였다. 각막상피를 기계적으로 제거한 후 엑시머레이저 각막절제술을 시술 한 후 한 쪽 눈에는 양막연고를, 반대측 눈에는 기질만 들어있는 연고를 점안하여 대조군으로 한다. 자세히 방법을 기술하면, 각막상피의 기계적 제거를 위해 개검기로 각막을 노출시킨 후 7 mm marker로 각막 중심부를 표시한 후, AMOILS Epithelial scrubber (Innova, USA)에 6 mm 직경의 brush를 부착하여 각막상피를 7 mm 직경으로 제거한다. 엑시머레이저는 flying spot방식의 193 nm 레이저 시스템(Telco, Australia)을 사용하여 직경 5 mm, -9 D, single zone으로 96  $\mu$ m 깊이로 각막실질을 절제한다. 우안은 양막연고를 점안한 실험군으로, 좌안은 양막성분만 빠진 기질연고를 점안하여 대조군으로 하였다. 모든 실험동물은 시술후 상하안검을 반창고로 붙이고 마취가 깰때까지 눈을 감겨놓아 각막의 건조를 방지하였다. 시술후 8시간, 16시간후 추가로 연고를 점안하고 24시간때 과용량의 phenobarbital을 귀정맥에 주사하여 희생시키고, 각막윤부를 포함하여 각막을 적출 하였다. 각막을 평평하게 유지시키기 위해 4 곳에 방사상 이완 절개를 한 후, 수술현미경하에서 상피결손부위가 중심에 오도록 하여 각막을 반으로 잘라 10 X 10 mm 크기의 cryoblock에 넣고 OCT 컴파운드(Sakura Finetek, USA)에 포매 시킨 후 액체질소에 넣어 급속 냉동한다. 냉동 조직을 microtome으로 6  $\mu$ m 두께로 잘라 염색에 사용한다.

□) The dyeing and cell count.

□) 염색 및 cell count

After each 5 number slide was dyed with the Hematoxylin-Eosin (H&E) to cut the freezing organization with a microtome with 6  $\mu$ m thickness, make the sample slide and confirming the Corneale deficit part and excimer laser keratectomy site as the optical microscope, it used the eom SeonDwan sample slide for the other dyeing. In the organization dyed with H&E, the polymorphonuclear leukocytes (polymorphonuclear cell, PMN) number permeated in the corneal stroma in the high-power field microscope ( $\times 400$ ) which was continued by using the optical microscope of 5 was added and it calculated. By using the fluorescein based in situ-death detection kit (Boehringer Mannheim., USA) in order to analyze the Apoptosis, it dyes with the TUNEL (terminal deoxyribonucleotidyl transferase mediated dUTP-digoxigenin nick end labeling) and the propidium iodide / antifade (Oncor, USA) is used for a safranin. The appropriately assembles the excitation and emission filter of the fluorescent microscope (Carl Zeiss, Germany) and causes the apoptosis cell shows up as the red fluorescence and the cell dyed in the propidium iodide which is a safranin to the green fluorescence observes the apoptotic nucleus the cell which. The keratocyte apoptosis number is measured in the consecutive high-power field microscope ( $\times 400$ ) of 5 and it sums.

냉동 조직을 microtome으로 6  $\mu$ m 두께로 잘라 표본 슬라이드를 제작하였는데 매 5번째 슬라이드를 Hematoxylin-

Eosin (H&E) 염색하여 광학 현미경으로 각막 상피 결손 부위와 엑시머레이저 각막절제 부위를 확인한 후 염색된 표본슬라이드는 다른 염색을 위해 사용하였다. H&E 염색된 조직에서 광학현미경을 이용하여 연속된 5 개의 고배율시야( $\times 400$ )에서 각막 실질에 침윤된 다형핵백혈구(polymorphonuclear cell, PMN) 수를 더하여 계산하였다. Apoptosis를 분석하기 위해서 fluorescein based in situ-death detection kit (Boehringer Mannheim, USA)를 이용하여 TUNEL (terminal deoxyribonucleotidyl transferase mediated dUTP-digoxigenin nick end labeling) 염색을 하고 대조염색을 위해 propidium iodide/antifade (Oncor, USA)를 사용한다. 형광현미경 (Carl Zeiss, Germany)의 excitation 과 emission 필터를 적절히 조합하여 apoptosis를 일으킨 세포는 초록색형광으로, 대조염색인 propidium iodide에 염색된 세포는 붉은색형광으로 나타나게 하여 apoptotic nucleus를 관찰하고, 연속한 5개의 고배율시야( $\times 400$ ) 에서 각막 실질세포 apoptosis 수를 측정하여 합한다.

By using the Vectastain Elite ABC Kit (Vector, USA) the malondialdehyde (MDA) which was the final product of the lipid peroxidation in order to inquire into the cell membrane lipid peroxidation extent by the oxygen free radical generated with the excimer laser irradiation, it was the speciality immunohistochemistry. As to the primary antibody, the second antibody used the biotinylated goat derived anti-rat IgG the antibody of the Dacron nature of the rat about MDA. And by using the diaminobenzidine terta hydrochloride (DAB) as the peroxidase substrate, it was discharge reacted and it observed this to the optical microscope. Each measured value statistically processes by ANOVA and Wilkason signed rank test and it finds out the anti-inflammation of the amnion ointment and apoptosis inhibitory action of a keratocyte, and the lipid peroxidation inhibitory action.

엑시머레이저 조사에 의해 생성된 산소유리기에 의한 세포막 지질 과산화(lipid peroxidation) 정도를 알아보기 위해 지질 과산화의 최종 산물인 malondialdehyde (MDA)을 Vectastain Elite ABC Kit (Vector, USA)을 이용하여 특수 면역 화학 염색하였다. 일차항체는 MDA에 대한 쥐의 다크론성의 항체를, 이차항체는 biotinylated goat derived anti-rat IgG를 사용하였으며, diaminobenzidine terta hydrochloride(DAB)를 과산화효소 기질로 사용하여 발색반응을 시키고 이를 광학현미경으로 관찰하였다. 각 측정치는 ANOVA와 Wilkason signed rank test로 통계처리 하여 양막연고의 항 염증작용과 각막 실질세포의 apoptosis 억제작용, lipid peroxidation 억제작용을 알아본다.

□) Result.

□) 결과

The amnion ointment group which was the experimental group statistically significantly wrote the inflammation cell and the TUNEL positive Apoptotic keratocyte number permeated in the corneal stroma in comparision with the control group. The intensity of the dyeing the MDA stain reflecting the lipid peroxiation of the amnion ointment group was less in comparision with the control group.

각막 실질에 침윤된 염증세포와 TUNEL positive Apoptotic keratocyte 수는 실험군인 양막연고군이 대조군에 비해 통계적으로 의미있게 적었다. lipid peroxiation을 반영하는 MDA stain도 양막연고군이 대조군에 비해 염색의 강도가 적었다.

Table 1. TUNEL( keratocyte apoptosis number: in consecutive X 400 high power field 5 place.

표 1. TUNEL( keratocyte apoptosis 수: 연속된 X 400 high power field 5곳에서

count))

count))

Table 1

Rabbits Rabbits	OD(AM oint group) OD(AM oint group)					sum sum	Average 평균	p p
1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	5 5	1.00 1.00	
2 2	6 6	6 6	9 9	1 1	1 1	23 23	4.60 4.60	
3 3	3 3	2 2	2 2	1 1	2 2	10 10	2.00 2.00	
4 4	1 1	1 1	1 1	2 2	1 1	6 6	1.20 1.20	
5 5	3 3	1 1	1 1	2 2	1 1	8 8	2.00 2.00	
6 6	3 3	5 5	1 1	2 2	4 4	15 15	3.00 3.00	
7 7	2 2	2 2	1 1	3 3	1 1	9 9	1.80 1.80	
8 8	1 1	2 2	3 3	2 2	1 1	9 9	1.80 1.80	
9 9	3 3	4 4	3 3	2 2	2 2	14 14	2.80 2.80	
10 10	8 8	2 2	2 2	2 2	2 2	16 16	3.20 3.20	
							2.34 2.34	0.000116 0.000116

Table 2

	OS(Control) OS(Control)						Average 평균
1 1	4 4	8 8	9 9	10 10	12 12	43 43	8.60 8.60
2 2	22 22	11 11	23 23	23 23	28 28	107 107	21.40 21.40
3 3	10 10	12 12	8 8	7 7	5 5	42 42	8.40 8.40
4 4	2 2	1 1	8 8	7 7	4 4	22 22	4.40 4.40
5 5	12 12	9 9	7 7	13 13	7 7	48 48	9.60 9.60
6 6	3 3	9 9	17 17	16 16	3 3	48 48	9.60 9.60
7 7	18 18	17 17	6 6	7 7	13 13	61 61	12.20 12.20
8 8	12 12	3 3	5 5	7 7	15 15	42 42	8.40 8.40



9 9	18 18	16 16	12 12	5 5	17 17	68 68	13.60 13.60
10 10	13 13	5 5	4 4	7 7	6 6	35 35	7.00 7.00
							10.32 10.32

《 student's test:syndesis1 comparison》

《t-검정: 쌍체 비교》

Table 3

	Variable 1 변수 1	Parameter 2 변수 2
Average 평균	11.5 11.5	51.6 51.6
Dispersion 분산	30.0556 30.0556	540.2667 540.2667
Observation number 관측수	10 10	10 10
Pearson correlation coefficient 피어슨 상관 계수	0.72982 0.72982	
Temporary installation mean difference 가설 평균차	0 0	
Degree of freedom 자유도	9 9	
T-statistic t 통계량	-6.4684 -6.4684	
P(T<=t) one-tail test P(T<=t) 단측 검정	5.8E-05 5.8E-05	
T critical value one-tail test t 기각치 단측 검정	1.83311 1.83311	
P(T<=t) two-sided test P(T<=t) 양측 검정	0.00012 0.00012	
T critical value two-sided test t 기각치 양측 검정	2.26216 2.26216	

Table 2. H&E( each intramembrane inflammatory cell number: in the consecutive X400 high power field 5 place.

표 2. H&E( 각막내 염증세포수: 연속된 X400 high power field 5곳에서

count)

count)

Table 4

Rabbits Rabbits	OD(AM oint group) OD(AM oint group)					sum sum	Average 평균	p p
1 1	32 32	53 53	78 78	44 44	27 27	234 234	46.8 46.8	
2 2	15 15	17	21	28	27	108 108	21.6 21.6	

		17	21	28	27			
3 3	14 14	27 27	30 30	19 19	25 25	115 115	23 23	
4 4	45 45	48 48	62 62	34 34	85 85	274 274	54.8 54.8	
5 5	17 17	16 16	16 16	14 14	29 29	92 92	18.4 18.4	
6 6	24 24	27 27	33 33	24 24	27 27	135 135	27 27	
7 7	42 42	94 94	60 60	78 78	77 77	351 351	70.2 70.2	
8 8	8 8	7 7	9 9	8 8	5 5	37 37	7.4 7.4	
9 9	14 14	15 15	15 15	17 17	12 12	73 73	14.6 14.6	
10 10	54 54	48 48	66 66	78 78	40 40	286 286	57.2 57.2	
							34.1 34.1	0.003578949 0.003578949

Table 5

	OS(Control) OS(Control)						Average 평균
1 1	58 58	77 77	88 88	97 97	100 100	420 420	84 84
2 2	87 87	44 44	58 58	98 98	87 87	374 374	74.8 74.8
3 3	27 27	29 29	44 44	22 22	21 21	143 143	28.6 28.6
4 4	77 77	95 95	85 85	121 121	88 88	466 466	93.2 93.2
5 5	18 18	21 21	27 27	45 45	13 13	124 124	24.8 24.8
6 6	52 52	23 23	30 30	31 31	37 37	173 173	34.6 34.6
7 7	122 122	115 115	38 38	44 44	52 52	371 371	74.2 74.2
8 8	42 42	17 17	13 13	22 22	27 27	121 121	24.2 24.2
9 9	38 38	42 42	41 41	35 35	27 27	183 183	36.6 36.6
10 10	37 37	55 55	61 61	87 87	131 131	371 371	74.2 74.2
							54.92 54.92

《 student's test:syndesis1 comparison》

《t-검정: 쌍체 비교》

Table 6

	Variable 1 변수 1	Parameter 2 변수 2
Average 평균	170.5 170.5	274.6 274.6

Observation number 관측수	10 10	10 10
Pearson correlation coefficient 피어슨 상관 계수	0.788075766 0.788075766	
Temporary installation mean difference 가설 평균차	0 0	
Degree of freedom 자유도	9 9	
T-statistic t 통계량	-3.907387395 -3.907387395	
P(T<=t) one-tail test P(T<=t) 단측 검정	0.001789475 0.001789475	
T critical value one-tail test t 기각치 단측 검정	1.833113856 1.833113856	
P(T<=t) two-sided test P(T<=t) 양측 검정	0.003578949 0.003578949	

#### ■ Effects of the Invention

While the amnion ointment simple to use coats the wound part of the skin and the various with a different including the photorefractive keratectomy etc. ophthalmology operation, expecting without the side effect to show the physiological anti-inflammation, and the anti-fibroblastic action, it can be used in the surgical operation through the purpose of suppressing the tissue adhesion or the ulosis.

사용하기 간편한 양막연고는 엑시머레이저 각막절제술등 여러 다양한 안과수술 및 피부의 창상부위에 도포함으로써 부작용없이 생리적인 항염증, 항섬유화작용을 나타낼 수 있을 것으로 기대하며 외과수술시 조직유착이나 반흔형성을 억제할 목적으로도 활용될 수 있다.



#### Scope of Claims

##### Claim[1] :

The harvesting method and method of keeping of the amnion containing the effective component.

유효한 성분을 함유한 양막의 채취방법 및 보관방법.

##### Claim[2] :

The manufacturing method of a saline and the eye ointment showing the box fiberization action and composition it does an amnion is to the effective component.

양막을 유효성분으로 함유하는 함염증 및 함섬유화 작용을 나타내는 안연고의 제조방법 및 조성물.